

УДК 576.893.161 : 576.5

К ВОПРОСУ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ЛЕЙШМАНИЙ И КЛЕТОК ХОЗЯЕВ IN VITRO

М. А. Савина, В. М. Сафьянова, А. Овезмухаммедов

В опытах перекрестного заражения перитонеальных макрофагов мышей лейшманиями рептилий (*L. gymnodactyli*) и свободных клеток перитонеальной полости кавказских агам лейшманиями млекопитающих (*L. major* и *L. donovani*) показана возможность размножения указанных видов в тех и других клетках. Размножение в мышинных макрофагах лейшманий млекопитающих и рептилий происходит более интенсивно, и инвазия сохраняется дольше, чем в клетках рептилий. Выявлены различия во времени интернализации лейшманий рептилий и млекопитающих в клетки рептилий. У первых этот процесс происходил быстрее, чем у вторых, что, возможно, связано с адаптацией к свойственным им хозяевам.

Попытки исследовать взаимоотношения лейшманий с неспецифическими для них хозяевами на клеточном уровне предпринимались и ранее. Белова и соавторы (1964) показали, что лейшмании, выделенные от каспийских гекконов, трансформируются в амастиготы и могут размножаться в 15 различных культурах клеток млекопитающих и даже в фибробластах куриных эмбрионов. К сожалению, авторы только констатировали этот факт, не приводя показателей инвазии и сроков наблюдения. В клетках саркомы собак Стикера Льюис (Lewis, 1974) наблюдал размножение лейшманий рептилий *Leishmania agamae*, тогда как относящиеся к этому же подроду *Sauroleishmania L. adleri* и *L. hoogstraali* вызывали лишь слабую инвазию этих клеток. Этому же автору удалось заразить лейшманиями млекопитающих *L. mexicana mexicana* мышечные клетки сердца черепах. Однако и здесь автор не сообщает о длительности наблюдения, а также о факте размножения лейшманий в клетках рептилий. Известно также сообщение Вейнмана (Weinman, 1939) о размножении амастигот *L. tropica* в куточках селезенки и легкого лягушки, помещенных на NNN-кровяной агар. С другой стороны, Олобо и соавторы (Olobo e. a., 1983) уже через сутки наблюдали дегенерацию *Leishmania* sp., выделенных от ящериц, в перитонеальных макрофагах мышей.

Таким образом, к настоящему времени показана принципиальная возможность заражения лейшманиями in vitro клеток неспецифических для них хозяев и размножения в них без детализации характера инвазионного процесса.

Целью нашей работы было исследовать in vitro характер паразито-хозяинных взаимоотношений лейшманий с клетками специфических и неспецифических для них хозяев с первых фаз контакта и в динамике до исхода инвазии и на этой основе попытаться выяснить степень специфичности этих отношений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

В опытах были использованы следующие виды и штаммы лейшманий: лейшмании млекопитающих *L. donovani* штамма DD-8, выделенного от больного ребенка в Индии в 1980 г. и полученного от проф. Петерса (W. Peters);

L. major штамма РК-К, выделенного от больного кожным лейшманиозом, заразившегося в Саудовской Аравии и полученного от д-ра Киллика-Кендрика (R. Killick-Kendrick) в 1982 г.; *L. gymnodactyli* штамма 3496-СА, выделенного от степной агама *Agama sanguinolenta* в Туркмении в 1982 г. Овезмухаммедовым.

Штаммы были взяты в опыт на 2—3-м пассажах после криопрезервации в фазе стационарного роста. В качестве клеток-хозяев использовали перитонеальные макрофаги мышей линии BALB/c и свободные клетки брюшной полости кавказских агам. Таким образом, были поставлены опыты перекрестного заражения клеток млекопитающих лейшманиями рептилий и, наоборот, клеток рептилий — лейшманиями млекопитающих. Для первого опыта были взяты перитонеальные макрофаги мышей, зараженные *L. gymnodactyli*, а в качестве контроля — такие же клетки, зараженные *L. major*. Для второго опыта были использованы свободные клетки брюшной полости агам, зараженные в одном случае *L. major*, а в другом — *L. donovani*, а в качестве контроля — такие же клетки, зараженные *L. gymnodactyli*.

Перитонеальные макрофаги мышей получали без предварительной стимуляции. Клетки от рептилий в достаточном количестве удавалось получить только после стимуляции 1 %-ным раствором крахмала или тиогликолятной средой за 4 дня до опыта. В смывах брюшной полости агам, кроме макрофагов, содержалось значительное количество фибробластов.

Клетки культивировали на покровных стеклах, от мышей — в среде 199 с 20 % бычьей сыворотки, клетки агам — в среде RPMI-1640 с 5—10 % эмбриональной бычьей сыворотки без добавления CO₂. В пробирки сеяли по 2 млн. клеток и заражали промастиготами лейшманий в соотношении 1 : 1. Клетки инкубировали при 32° во всех случаях, кроме одного, где контролем к культуре клеток агам, зараженных *L. donovani* и содержащихся при 32°, служили такие же культуры, содержащиеся при 37°. Препараты фиксировали через 2 ч после заражения, а затем ежедневно до 5—10 сут в разных экспериментах. Одновременно фиксировали 2—3 препарата одной и той же культуры. В каждом препарате просматривали 200—500 клеток. Препараты фиксировали 100-градусным метанолом и окрашивали по Романовскому—Гимза. Ряд препаратов просматривали прижизненно с фазовым контрастом.

Для оценки состояния инвазии в культуре клеток подсчитывали процент инвазированных клеток и интенсивность инвазии — среднюю арифметическую числа паразитов на клетку. Учитывали также соотношение амастигот и промастигот, наличие размножающихся и разрушающихся амастигот и максимальное число паразитов в клетке. О размножении амастигот судили по симметрично попарно расположенным ядрам и кинетопластам, скоплениям амастигот в виде кольца или плотного конгломерата, а также по увеличению их количества в клетках. Результаты обработаны статистически с использованием критериев χ^2 и Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольном эксперименте при заражении макрофагов мышей лейшманиями млекопитающих (*L. major*) развитие инвазии прослежено с 2 ч до 12 сут (рис. 1, I, II). Максимум инвазии по показателям интенсивности заражения и проценту зараженных клеток приходился на 2 ч — период завершения фагоцитоза, затем к 2-м суткам следовало снижение уровня инвазии, связанное с интенсивным разрушением амастигот, а к 3-м и 8-м суткам достоверное повышение этих показателей (соответственно $\chi^2=67.8$ и 195 при $P<0.001$), обусловленное размножением амастигот (рис. 1, VII; 2, I; см. вкл.). Следует подчеркнуть, что размножение амастигот *L. major* наблюдалось на протяжении всех 12 сут опыта, причем процент амастигот увеличивался, достигая максимума

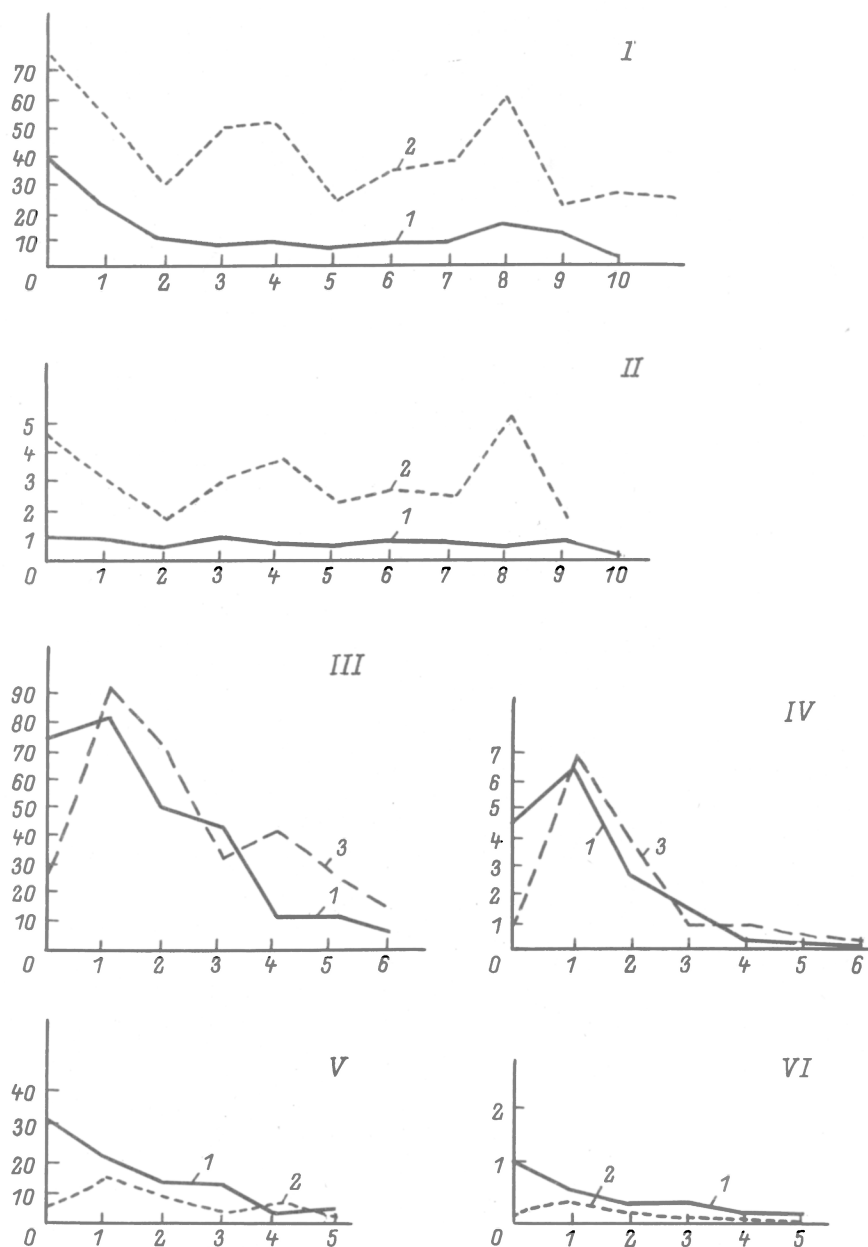


Рис. 1. Развитие инвазии в макрофагах мышей и кавказских агам, вызванной лейшманиями млекопитающих и рептилий.

I — процент зараженных макрофагов мышей линии BALB/c лейшманиями *L. gymnodactyli* и *L. major*, по оси ординат — процент зараженных клеток; *II* — интенсивность заражения этих же макрофагов *L. gymnodactyli* и *L. major*, по оси ординат — средняя арифметическая числа лейшманий в клетке; *III* — процент зараженных клеток перитонеальной полости кавказских агам *L. gymnodactyli* и *L. donovani*, по оси ординат — процент зараженных клеток; *IV* — интенсивность заражения этих же клеток *L. gymnodactyli* и *L. donovani*, по оси ординат — средняя арифметическая числа лейшманий в клетке; *V* — процент зараженных клеток перитонеальной полости кавказских агам *L. gymnodactyli* и *L. major*, по оси ординат — процент зараженных клеток; *VI* — интенсивность заражения этих же клеток *L. gymnodactyli* и *L. major*, по оси ординат — средняя арифметическая числа лейшманий в клетке. 1 — *L. gymnodactyli*; 2 — *L. major*; 3 — *L. donovani*. По оси абсцисс — время в сутках, ноль соответствует 2 ч.

(97 %) к 10-му дню. Одновременно постоянно обнаруживались промастиготы, не только внутри, но и вне клеток, которые, вероятно, трансформировались из амастигот, освободившихся из разрушенных клеток. У интенсивно инвазированных клеток ядро имело сморщенный и даже деформированный вид (рис. 1, VII; 2, 2). На 12-е сутки промастиготы составляли 11.4 % всех паразитов, что, видимо, указывает на усилившееся разрушение клеток. Максимальная зараженность отдельных клеток составляла 30—70 паразитов.

При параллельном заражении мышинных макрофагов лейшманиями рептилий (*L. gymnodactyli*) исходный уровень инвазии (через 2 ч) оказался ниже, чем в приведенном контроле (рис. 1, I, II). Позднее он оставался стабильно низким и практически не изменялся до конца наблюдений.

У лейшманий рептилий, как и у *L. major*, промастиготы активно трансформировались в амастиготы и уже через 2 ч они составляли 72 %, а в дальнейшем их процент был не ниже, чем у *L. major*. Однако в отличие от последних размножающиеся амастиготы *L. gymnodactyli* выявлялись лишь с 4-х суток после заражения (рис. 1, VII; 2, 3) и до конца наблюдений (рис. 1, VII; 2, 4). Обращало на себя внимание наличие отдельных интенсивно инвазированных клеток, в которых насчитывалось 4—7 десятков лейшманий (рис. 1, VII; 2, 5). При этом соседние клетки часто были совершенно свободны от паразитов. При прижизненном наблюдении с фазовым контрастом подвижные промастиготы *L. gymnodactyli* в вакуолях мышинных макрофагов обнаруживались до 7-х суток с момента заражения.

В культуре клеток брюшной полости кавказских агам, зараженных лейшманиями млекопитающих (*L. donovani*), выявилась принципиально иная динамика инвазии на первых фазах контакта с клетками (рис. 1, III, IV). В культурах, содержащихся при 32°, инвазия достигала максимума только через сутки с момента заражения, что, видимо, обусловлено более поздним завершением интернализации лейшманий. Различия в проценте и интенсивности зараженности клеток через 2 ч и 1 сут статистически достоверны (соответственно $\chi^2=221$ при $P<0.001$ и $t=17.9$ при $P<0.001$).

Инвазирование этих же клеток рептильным штаммом (рис. 1, III, IV) происходило более активно: процент зараженных клеток и интенсивность инвазии оказались высоки уже через 2 ч с момента заражения. Через 1 сут показатели инвазии еще более возросли. Различия в показателях через 2 ч и 1 сут менее выражены, чем у *L. donovani*, но также статистически достоверны ($\chi^2=4.3$; $P<0.05$ и $t=4.2$; $P<0.001$). На 2-е и 3-и сутки происходит постепенное снижение уровня инвазии клеток обоими видами лейшманий, однако более медленное, чем в макрофагах мышей. В последующие дни снижение продолжалось, достигнув минимума к 6-м суткам. Уровень численности лейшманий рептилий в специфическом хозяине оказался ниже, чем в неспецифическом.

L. donovani, попавшие в клетки рептилий, превращаются в амастиготы, причем высокий уровень их достигается только к 3—4-м суткам с момента заражения. Размножающиеся амастиготы мы выявляли лишь на 1-е, 2-е, 5-е и 6-е сутки. Несмотря на наличие отдельных размножающихся амастигот, накопления *L. donovani* в клетках агам не происходило. Процент разрушающихся паразитов со временем нарастал, и они постепенно элиминировались. Максимально в клетках в первые дни насчитывали до 26 амастигот, а в 3 последних — не более 11. При культивировании клеток агам, зараженных *L. donovani*, при 37° в их морфологии не обнаружено отличий от клеток, инкубированных при 32°. При сходном характере динамики инвазирования клеток в этих условиях процент и интенсивность их заражения оказались значительно ниже, чем при 32°.

Динамика паразитирования лейшманий рептилий в клетках агам со 2-х суток после заражения не отличалась от таковой *L. donovani*. Однако размножение амастигот *L. gymnodactyli* наблюдали на всем протяжении опыта (рис. 1, VII;

2, 6, 7). Массовое разрушение амастигот также приходилось на 4-е и 5-е сутки.

В другом аналогичном опыте заражали клетки перитонеальной полости агам *L. major* и *L. gymnodactyli*. В этом случае также наблюдали различия в показателях, характеризующих фазу интернализации паразитов этих видов (рис. 1, V, VI). Проникновение *L. major* в клетки завершалось только через 1 сут. Различия процента и интенсивности заражения клеток *L. major* через 2 ч и 1 сут статистически достоверны (соответственно $\chi^2=17.6$; $P<0.001$, $t=2.8$; $P<0.01$). Напротив, максимальная инвазия клеток агам *L. gymnodactyli* достигалась уже через 2 ч, а через 1 сут ее уровень статистически достоверно снизился ($\chi^2=18.4$; $P<0.001$ и $t=3.8$; $P<0.001$). Хотя деление амастигот обоих видов происходило, накопления их по ходу инвазии не наблюдалось (рис. 1, VII; 2, 8, 9).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований была подтверждена возможность проникновения промастигот лейшманий в клетки неспецифического для них хозяина, перехода в амастиготу и размножения в них. Однако на первых фазах взаимодействия лейшманий с клетками специфических и неспецифических для них хозяев выявились определенные различия. Оказалось, что активность интернализации промастигот в клетки специфического для них хозяина была выше, чем в клетки неспецифического. Особенно сильно это проявилось в культуре клеток брюшной полости агам. Менее активная, чем у *L. gymnodactyli*, интернализация наблюдалась как у *L. major*, так и *L. donovani*. Возможно, что этот факт обусловлен некоторой избирательностью фагоцитоза разных видов лейшманий макрофагами специфических и неспецифических для них хозяев, что отмечал и Ардеали (Ardehali, 1978). Не исключена также частичная роль активного проникновения лейшманий в клетки (особенно в фибробласты агам), способность к которому неодинакова у разных видов паразитов (Chang, 1978).

Различия в состоянии популяций возбудителя в клетках специфического и неспецифического для них хозяина проявилась и на более поздних стадиях взаимодействия. Уровень численности *L. major* в клетках мышей до конца наблюдений оказался выше, чем у *L. gymnodactyli*. В отличие от первых у *L. gymnodactyli* размножающиеся амастиготы появились только с 4-го дня от момента заражения, а затем обнаруживались до конца опыта. В клетках агам динамика численности всех трех видов оказалась сходной, но размножающиеся амастиготы лейшманий млекопитающих найдены не во все сроки наблюдения, тогда как рептилий — постоянно. Несмотря на наличие размножающихся амастигот лейшманий, повышения их численности в клетках рептилий не происходило, и инвазия элиминировалась к 5—6-му дням, т. е. переваривающая способность макрофагов агам оказалась выше, чем макрофагов мышей.

Таким образом, определенная степень специфичности взаимоотношений паразита с клеткой проявилась как на стадии внедрения, так и размножения в клетке.

Л и т е р а т у р а

- Белова Е. М., С. Е. Глейberman, В. М. Сафьянова. Предварительные итоги изучения лептомонд, обнаруживаемых у gekkonov в Туркменской ССР. — Здравоохранение Туркменистана, 1964, № 9, с. 29—34.
- Ardehali S. M., Khoubyar K. Uptake of different Leishmania by mouse peritoneal exudate cells. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1978, vol. 72, N 6, p. 645—646.
- Chang K.-P. Leishmania infection of human skin fibroblasts in vitro: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes and their intracellular transformation. — Am. J. Trop. Med. Hyg., 1978, vol. 27, N 6, p. 1084—1096.

- Lewis D. H. Infection of tissue culture of low phagocytic ability by *Leishmania mexicana mexicana*. — Ann. Trop. Med. Parasitol., 1974, vol. 68, N 3, p. 327—336.
- Olobo J. O., Mutinga M. J. Uptake of promastigotes of a lizard *Leishmania* sp. and *Leishmania donovani* by mouse peritoneal macrophages. — Acta tropica, 1983, vol. 40, N 1, p. 89—91.
- Weinman D. Factors affecting the morphology of *Leishmania tropica*. The production of *Leishmania* forms in cultures. — Parasitology, 1939, vol. 31, N 2, p. 185—192.

НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва;
Институт зоологии АН ТССР, Ашхабад

Поступила 11. 11. 1985
после доработки 12. 06. 1987

SPECIFICITY OF INTERRELATIONS BETWEEN LEISHMANIA AND CELLS-HOSTS IN VITRO

M. A. Savina, V. M. Safjanova, A. Ovezmukhammedov

S U M M A R Y

Experiments on cross infection of peritoneal macrophags of mice with *Leishmania* of reptiles *L. gymnodactyli* and free cells of abdominal cavity of caucasian *Agama* (some part of which is composed by fibroblasts) with *Leishmania* of mammals *L. major* and *L. donovani* have shown the possibility of reproduction of the above species both in reptiles and mammals. The persistence of *L. gymnodactyli* and *L. major* in macrophags of mice was traced up to 10 days, the abundance of *L. gymnodactyli* during the whole period of observations being lower than that of *L. major*. The abundance of the above *Leishmania* in these cells happened to be higher than in the cells of reptiles. In the cells of reptiles the infection with these three species of *Leishmania* was eliminated by 5—6 days. More activite internalization of *Leishmania* of reptiles into cells of reptiles as compared to *Leishmania* of mammals was revealed that, apparently, reflects a definite degree of their adaptation to existence in reptiles in vivo.

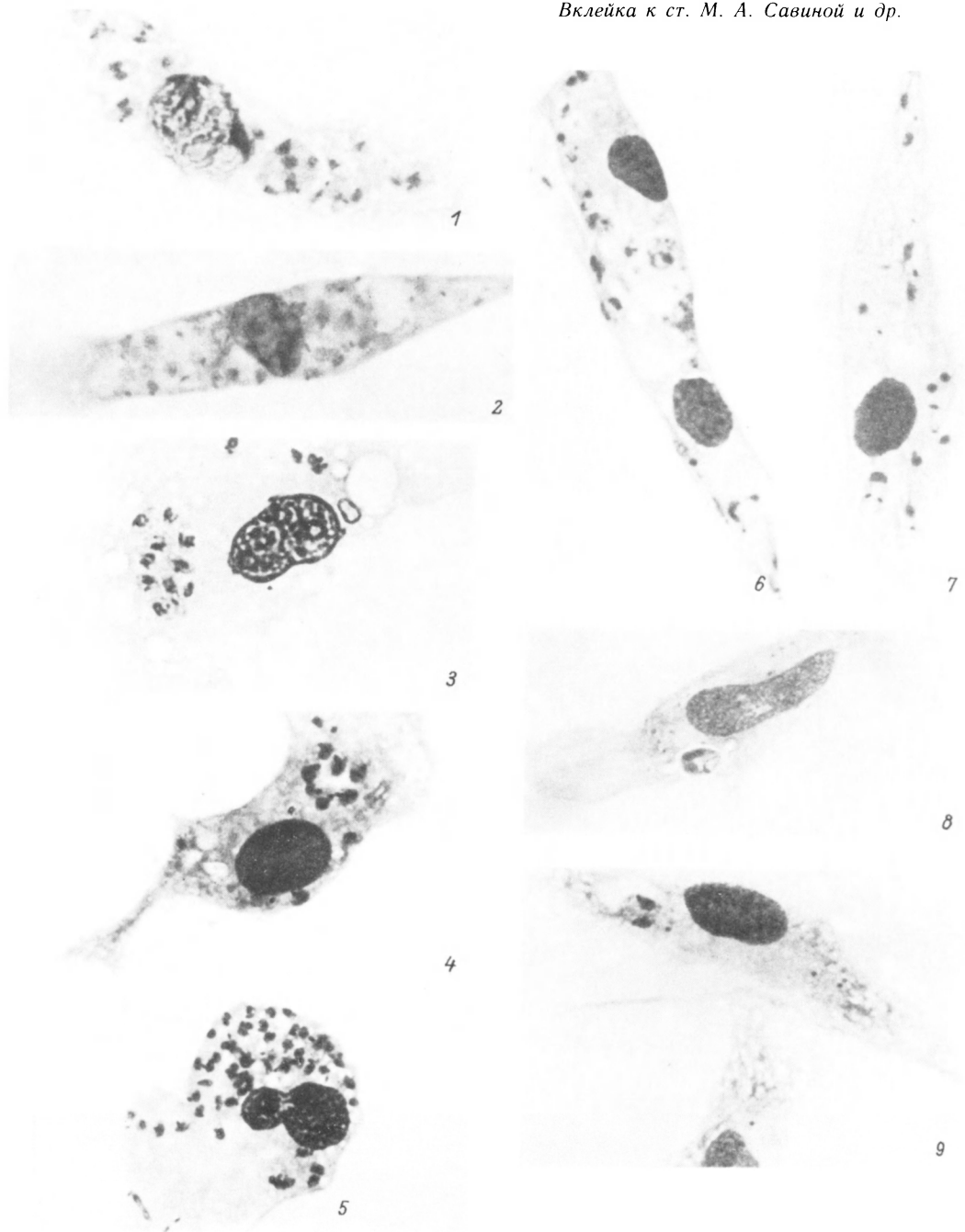


Рис. 2. Макрофаги мышей и кавказских агам, зараженные лейшманиями млекопитающих и рептилий.

1 — размножающиеся амастиготы *L. major* в разрушающемся макрофаге мыши на 8-е сутки после заражения; 2 — интенсивно инвазированный разрушающимися амастиготами *L. major* макрофаг мыши с деформированным ядром на 8-е сутки после заражения; 3 — размножающиеся амастиготы *L. gymnodactyli* в разрушающемся макрофаге мыши; 4 — группа размножающихся амастигот *L. gymnodactyli* в макрофаге мыши через 8 сут после заражения; 5 — интенсивно инвазированный *L. gymnodactyli* макрофаг мыши через 3 сут после заражения; 6, 7 — лейшмании *L. gymnodactyli* в клетках из брюшной полости кавказской агамы через 3 сут после заражения; 8, 9 — делящиеся амастиготы *L. major* в клетках из брюшной полости кавказской агамы через 4 сут после заражения.